Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 19, No. 2, May-June 2023, p. 311-331

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۹، شماره ۲، خرداد- تیر ۱۴۰۲ ص. ۳۳۱-۳۱۱

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir
Research Paper

Isolation and Characterization of *Lactiplantibacillus plantarum* Bacteriocin from Fruit-based Fermented Products and its Comparison with Commercial Nisin

M. Noktehsanj Avval[1], M. Hosseininezhad[2*], A. Pahlavanlo[3], H.B. Ghoddusi[4]

Received: 2021.12.13
Revised: 2022.02.08
Accepted: 2022.02.19
Available Online: 2022.05.15

How to cite this article:
Noktehsanj Avval, M., Hosseininezhad, M., Pahlavanlo, A., & Ghoddusi, H.B. (2023). Isolation and characterization of *Lactiplantibacillus plantarum* bacteriocin from fruit-based fermented products and its comparison with commercial nisin. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, *19*(2), 311-331. http://doi.org/10.22067/ifstrj.2022.74158.1122

Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) and their bacteriocins are widely used as natural and safe preservatives in food products, to control both pathogenic and spoilage microorganisms. This study aimed to isolate and identify LAB from several traditionally produced fermented fruits and vegetables from different parts of Iran, screening their potentials for producing bacteriocin-like substances production and evaluate their antimicrobial activities against various pathogens. The effect of heat treatment and different pH values on the stability of bacteriocins were also assessed and compared with commercial nisin for their possible application in the food industry as an alternative to chemical preservatives.

Materials and Methods

Lactic acid bacteria were isolated from several fermented products like hawthorn, mixed fruit pickles containing quince and apple, mango, and medlar. pickle, and tThe isolates were identified using phenotypic (physiological and biochemical) and genotypic (16S rDNA gene sequencing) methods followed by drawing phylogenetic tree based on the neighbor-joining method. The bacteriocins were prepared from the neutralized and cell-free supernatant (CFS). To precipitate the bacteriocins, ammonium sulfate (75%), potassium phosphate buffer, and methanol-chloroform were used, and extraction was completed with a high-speed centrifugecentrifugation. After freeze-drying, the precipitate was kept as crude bacteriocin. The bacteriocin activity was measured by the critical method, and the effect of heat, storage time and pH on the stability of bacteriocins was evaluated. The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum inhibitory bactericidal concentration (MBC) of the examined bacteriocins were determined on against the pathogenic strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and compared with commercial nisin.

Results and Discussion

In this research, from 162 isolated strains of LAB, four isolates (10A, S6, Sa, and Ab) were selected based on the highest amount of antimicrobial compounds and diameter of the inhibitory zone against pathogenic strains. then the isolates were identified as different strains of *Lactiplantibacillus plantarum* (previously classified as *Lactobacillus plantarum*). The phylogenetic position of the isolates was determined by drawing a phylogenetic tree. The drawn tree

1, 2 and 3- Ph.D. Student, Professor and Assistant Professor, Department of Food Biotechnology, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran, respectively.
(*- Corresponding author Email: m.hosseininezhad@rifst.ac.ir)
4- Head, Microbiology Research Unit (MRU), Food Science (MSc), Course Leader School of Human Sciences, London Metropolitan University, London, UK
DOI: 10.22067/ifstrj.2022.74158.1122

consists of two clusters and the first cluster consist of two sub-clusters, with two different strains of *L. plantarum* in each of them. In the next step, bacteriocin of the isolates was extracted using saturated ammonium sulfate and high-speed (23000g) centrifugingcentrifugation. Partially purified bacteriocins from different species showed high inhibitory effects on tested indicators, which were estimated, for *L. plantarum* 3360 (10A) and *L. plantarum* lb51 (Ab), 64000 AU/ml against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. All selected bacteriocins indicated a stable effect at different temperatures of 60 and 121°C for 20 min and 4 and -20°C for 6 months, this effect was the examined bacteriocins were also stable against at acidic and alkaline pHs too. Also, the inhibitory property decreased under very acidic (pH < 3) and very alkaline (pH > 8) conditions, but this reduction was not significant at the 95% confidence level. Bacteriocins with 64000 AU/mL activity had higher antimicrobial properties against the pathogens compared to an equal amount of commercial NiseenNisin-S (680 AU/mL). The results of MIC and MBC showed that isolates 10A and Ab have the highest inhibitory properties compared to other extracted bacteriocins and/or nisin. Since heat and chemical preservatives are used in food preparation, the stability of bacteriocins against heat and different pH is important, therefore, after extraction and purification, the extracted bacteriocins can be used as a biological preservative in the production of various food products in the range of acidic and alkaline pH, including juices, meat products, and sauces. Encapsulation of these peptides and their application in food products needs further investigation.

Keywords: Bacteriocin, *Lactiplantibacillus plantarum*, Phylogenetic tree, Sequencing

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 19, No. 2, May-June 2023, p. 311-331

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۹، شماره ۲، خرداد - تیر ۱۴۰۲ ص. ۳۳۱-۳۱۱

مقاله پژوهشی

جداسازی و تعیین ویژگی باکتریوسین حاصل از باکتری *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* جدا شده از فراورده‌های تخمیری بر پایه میوه و مقایسه با نایسین تجاری

مهسا نکته سنج اول[۱]- مرضیه حسینی نژاد[۲*]- ابوالفضل پهلوانلو[۳]- حمید بهادر قدوسی[٤]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۲۲
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۱۱/۱۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۳۰

چکیده

در این پژوهش باکتری‌های اسید لاکتیک از چندین فراورده تخمیری بر پایه میوه (شامل فراورده تخمیری زالزالک، مخلوط میوه به و سیب ترش تخمیری، انبه تخمیری و ازگیل تخمیری)، جداسازی و از نظر ویژگی ضدمیکروبی و تولید باکتریوسین مورد ارزیابی قرار گرفتند. بعد از انجام آزمون‌های فنوتیپی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی، از مجموع ۱۶۲ سویه جدا شده، چهار سویه اسیدلاکتیک، با تولید بیشترین مقدار باکتریوسین بر مبنای قطر هاله بازدارندگی جداسازی و با استفاده از روش تعیین توالی 16S rDNA به‌عنوان سویه‌های مختلف *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* شناسایی شدند. باکتریوسین‌های سویه‌های انتخابی که با کمک آمونیوم سولفات استخراج و بطور نسبی خالص‌سازی گردیدند قابلیت ممانعت‌کنندگی از رشد، در برابر شاخص‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی*، *سالمونلا تایفی موریوم* و *لیستریا مونوسایتوژنز* از خود نشان دادند. فعالیت ضدمیکروبی باکتریوسین‌های هر چهار سویه در حرارت‌های ۶۰ و ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه پایدار بود و این ویژگی در دماهای ۴ و ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ماه حفظ شد. پایداری قدرت بازدارندگی در محدوده pH (۸-۳) با کاهش معنی‌دار (p<۰/۰۵) در pHهای پایین‌تر از ۳ و بالاتر از ۸ گزارش گردید. میانگین MIC باکتریوسین‌ها، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر و با نایسین در رقت ۶۸۰Au/ml داشت (p<۰/۰۵) و باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* حساسیت بیشتری از *اشریشیا کلی* در برابر باکتریوسین‌ها از خود نشان داد. باکتریوسین‌های تخلیص شده در مقایسه با نایسین تجاری، قدرت ضدمیکروبی بالاتری در برابر سویه‌های بیماری‌زای مورد بررسی داشتند. از آنجایی‌که در فرایند تولید و فرآوری محصولات غذایی حرارت و pH به‌عنوان دو عامل کلیدی هستند، پایداری ویژگی ضدمیکروبی باکتریوسین در برابر حرارت و pHهای مختلف قابلیت استفاده این ترکیبات زیستی به‌عنوان نگهدارنده ایمن در فراورده‌های مختلف و امکان جایگزینی نایسین با ترکیبات باکتریوسین تخلیص شده را نشان می دهد. پژوهش در خصوص ریزپوشانی و بکارگیری باکتریوسین‌های استحصالی در فراورده‌های غذایی ادامه دارد.

واژه‌های کلیدی: باکتریوسین، توالی‌یابی، درخت فیلوژنتیکی، *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم*

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانش‌آموخته دکتری، استاد و استادیار گروه زیست‌فناوری مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: m.hosseininezhad@rifst.ac.ir)
۴- دانشیار، واحد تحقیقات میکروبیولوژی (MRU)، دانشکده علوم انسانی، دانشگاه متروپولیتن لندن، لندن، انگلستان

DOI: 10.22067/ifstrj.2022.74158.1122

مقدمه

از زمان‌های کهن، تخمیر به‌عنوان یک روش آسان و کاربردی برای جلوگیری از فساد سبزی‌ها و میوه‌ها جهت بهبود خواص تغذیه‌ای و ویژگی‌های حسی این فراورده‌ها مورد استفاده قرار می‌گرفته است (Ashtiani *et al*., 2020). فراورده‌های تخمیری بر پایه میوه و سبزی عمدتا حاوی گروه متنوعی از باکتری‌های اسیدلاکتیک هستند که علاوه بر بهبود هضم و افزایش مقدار ویتامین‌ها، قابلیت تولید ترکیبات ضدمیکروبی را داشته و نقش بی بدیلی در تثبیت جمعیت میکروبی مفید روده دارند (Grosu-Tudor and Zamfir, 2011). مهم‌ترین جنس‌های باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB)[1] شامل لاکتوباسیلوس، لاکتوکوکوس، استرپتوکوکوس، انتروکوکوس و اسپورولاکتوباسیلوس می‌باشند (Rodríguez *et al*., 2012). یکی از گونه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک، ساپروفیتی به نام *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* است (Singh and Sethi, 2018) که در تولید فراورده‌های تخمیری مانند گوشت و فراورده‌های گوشتی (Garriga et al., 1993)، نوشیدنی‌های تخمیری (Navarro *et al*., 2000)، خمیر ترش (Todorov *et al*., 1999)، پنیر (Gonzalez *et al*., 1994)، خیار تخمیر شده و زیتون (Jiménez-Díaz *et al*., 1993)، آناناس و عصاره گریپ فروت (Kelly *et al*., 1996) و بسیاری از منابع غذایی دیگر نقش عمده‌ای دارد. این باکتری *که در گذشته لاکتو باسیلوس پلانتاروم* نامیده می‌شد (Zheng *et al*., 2020)، به عنوان آغازگر کشت در تهیه بسیاری از فراورده‌های تخمیری مورد استفاده قرار می‌گیرد.

بسیاری از سویه‌های *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* مواد ضد-میکروبی بنام باکتریوسین تولید می‌کنند (Blana *et al*., 2014). باکتریوسین‌ها دارای خواص فراسودمند بسیاری از جمله سمیت پایین، قابلیت بازدارندگی از رشد سویه‌های بیماری‌زا در هر دو طیف زنجیره پپتیدی کوتاه (با تعداد اسید آمینه کم) و زنجیره بلند، قابلیت تولید توسط گونه‌های مختلفی از باکتری‌های اسید لاکتیک بوده و به‌عنوان جایگزینی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و نگهدارنده‌های شیمیایی شناخته شده‌اند (Noktehsanj Hosseininezhad and Yazdi, 2016 ; Avval *et al*., 2023). این ترکیبات ضدمیکروبی به‌عنوان پپتیدهای زیست فعال ریبوزومی با افزایش نفوذپذیری غشای سیتوپلاسمی سلول‌های هدف، انتشار ذرات کوچک سیتوپلاسمی، دپلاریزاسیون پتانسیل غشایی، ایجاد نیروی حرکتی پروتون جهت تشکیل منفذ در دیواره سلولی، غیر فعال‌سازی لیپید II، از بین بردن پتانسیل غشایی و کاهش غلظت ATP درون سلولی باعث مرگ سلول هدف می‌شوند (Zheng *et al*., 2020).

باکتریوسین‌های تولید شده توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک بدلیل القاء ویژگی بازدارندگی در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عوامل فساد در مواد غذایی و بدلیل امکان استفاده بالقوه در حفظ و نگهداری مواد غذایی به‌عنوان نگهدارنده بیولوژیک طبیعی و ایمن توجه پژوهشگران را به خود جلب کرده است (Gálvez *et al*., 2007). از دیگر سو نگرانی‌های اخیر ایجاد شده در حوزه پزشکی به‌دلیل ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در برابر بسیاری از سویه‌های بیماری‌زا، سبب شده تا استفاده از باکتریوسین‌ها در حوزه سلامت، به‌عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها و خصوصا از بین بردن باکتری‌های بیماری‌زا اهمیت پیدا کند (Calo-Mata *et al*., 2008). به طور کلی باکتریوسین‌های جدا شده از *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* پلانتارسین نامیده می‌شوند(Chen *et al*., 2018)). که اکثر آن‌ها مانند پلانتارسین LR14 (Tiwari and Srivastava, 2008) و پلانتارسین SR18 (El-Shouny *et al*., 2020) فعالیت مهاری زیادی علیه سویه‌های بیماری‌زا نظیر *لیستریا مونوسایتوژنز* نشان می‌دهند. باکتریوسین‌های استخراج شده از لاکتوباسیلوس‌ها، به‌دلیل حفظ ویژگی مهاری در برابر فرایندهای مختلف حرارتی، اسیدی، قلیایی و همچنین طیف وسیعی از بیماری‌زاهای گرم مثبت و منفی قابلیت کاربرد به‌عنوان متابولیت‌های ضدمیکروبی طبیعی در فراورده‌های غذایی و دارویی دارند (Alizadeh Behbahani *et al*., 2021).

بررسی منابع متعدد نشان داد که تاکنون تمرکز اکثر پژوهش‌ها در ارتباط با جداسازی سویه‌های تولیدکننده باکتریوسین از فراورده-های لبنی بوده و در زمینه فراورده‌های تخمیری بر پایه میوه و سبزی پژوهش‌های کمتری صورت گرفته است. همچنین در پژوهش‌های پیشین بیشتر به جداسازی سویه‌های اسیدلاکتیک تولیدکننده باکتریوسین پرداخته شده است در حالی که جداسازی و خالص‌سازی باکتریوسین به‌عنوان یک موضوع جدید طی چند سال گذشته مورد بحث و توجه است. تاکنون جداسازی و خالص‌سازی باکتریوسین از تعداد اندکی از فراورده‌های تخمیری بر پایه میوه نظیر آناناس و عصاره گریپ فروت تخمیری (Kelly *et al*., 1996)، ترشی کلم پیچ (Szutowska *et al*., 2021)، زغال اخته تخمیر شده (Xiang *et al*., 2021) و ترشی میوه انجیر هیمالیا (Kumari *et al*., 2018) صورت پذیرفته است، علاوه بر این در مورد *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* و سایر باکتری‌های اسید لاکتیک بیشتر به ویژگی ضد-میکروبی آنها در مورد سویه‌های هم نوع خود (باکتری‌های گرم مثبت) و همچنین ویژگی ضد *لیستریایی بعضی از* آن‌ها پرداخته شده و ویژگی ضدمیکروبی سایر بیماری‌زاهای گرم منفی چندان مورد بررسی واقع نشده است. در این پژوهش علاوه بر سویه‌های گرم مثبت، اثر

1- Lactic acid bacteria

باکتریوسین‌های استخراج شده از فراورده‌های بومی بر چند سویه گرم منفی نیز بررسی شده است.

پژوهش حاضر که با هدف بهره‌گیری از منابع اولیه جدید بر پایه فراورده‌های تخمیری غیر لبنی، عمدتا فراورده تخمیری بر پایه میوه برای جداسازی سویه‌های اسید لاکتیک تولیدکننده باکتریوسین صورت گرفته، سعی دارد پس از جداسازی و خالص سازی نسبی باکتریوسین با نمونه‌های تجاری مشابه مانند نایسین که طی سالیان متمادی در تولید و نگهداری انواع محصولات غذایی (لبنی و غیر لبنی) کاربرد داشته است مقایسه گردد. همچنین کارایی ضدمیکروبی باکتریوسین استحصالی برای از بین بردن هر دو طیف باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت، در دماها و pH های مختلف و مدت زمان نگهداری در دمای انجماد و یخچالی مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

مواد خام و سویه‌های استفاده شده

محیط‌های کشت استفاده شده در این پژوهش شامل MRS[1] براث، MRS آگار، مولر هینتون براث، مولر هیینون آگار و آگار- آگار از شرکت شارلو فرانسه و مرک آلمان، کربوهیدرات‌های گلوکز، ساکارز، لاکتوز، آرابینوز، مانیتول، زایلوز، گالاکتوز، مالتوز، فروکتوز از شرکت‌های داخلی و سیگما آلدریچ، پرایمرها و مستر میکس به ترتیب از شرکت‌های سیناکلون و دنازیست، سویه‌های بیماری‌زا شامل، *لیستریا مونوسایتوجنز* PTCC ۱۱۶۵، *اشریشیا کلی* ATCC ۲۵۹۲۳، *سالمونلا انتریکا* سرووار *تایفی موریوم* PTCC ۱۶۰۹، *استافیلوکوکوس اورئوس* ATCC ۲۵۹۲۲ و *لاکتوباسیلوس رئوتری* به عنوان سویه تولید کننده باکتریوسین و سویه کنترل مثبت، از آزمایشگاه میکروبی موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی (RIFST)، فراورده‌های تخمیری بر پایه میوه، مخلوط میوه تخمیری حاوی به و سیب ترش، فراورده تخمیری زالزالک، انبه و ازگیل، که بومی ایران بودند از بازارهای محلی و نایسین تجاری Niseen – S از شرکت (Siveele) هلند خریداری شدند.

جداسازی سویه‌های اسیدلاکتیک بومی

جهت جداسازی سویه‌های اسید لاکتیک از فراورده‌های تخمیری بر پایه میوه مقدار ۱۰ گرم از هر یک از نمونه‌ها در ۹۰ میلی‌لیتر از پیتون واتر استریل همگن و بعد از تهیه رقت‌های متوالی، کشت سطحی بر روی محیط کشت MRS آگار حاوی بتا هگزامید و سیکلودکسترین انجام شد تا کلنی‌های متفاوت از نظر ویژگی‌های ظاهری انتخاب گردد و کپک و مخمر احتمالی موجود در نمونه از بین برود سپس جهت رشد کلنی‌ها پلیت‌ها در دمای ۳۷ °C، تحت شرایط کاملا بی‌هوازی به مدت ۴۸-۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند (Ahn *et al.*, 2017; Attar *et al.*, 2081).

تعیین ویژگی آنتاگونیستی سویه‌ها علیه باکتری‌های شاخص

این آزمون با روش کشت نقطه‌ای بر روی آگار (Agar spot) و کشت دو لایه انجام گردید. بدین منظور جدایه‌ها در محیط MRS براث در دمای ۳۷°C به مدت ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند، سپس ۲ میکرولیتر از این محیط بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار به روش Agar spot کشت شد. بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد و رویش کلنی‌ها، محیط کشت مولر هینتون با آگار نرم (۰/۸ درصد) که با باکتری شاخص با دوز 10^8 CFU/mL تلقیح شده بود برروی محیط قبلی اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت دیگر جهت بررسی ویژگی بازدارندگی و اندازه‌گیری هاله عدم رشد، در۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گزاری شد (Fagundes *et al.*, 2017).

شناسایی باکتری‌های LAB بر مبنای آزمایش‌های فنوتیپی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

به منظور شناسایی اولیه جدایه‌ها آزمایش‌های رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز و ایندول طبق روش (Hwanhlem *et al.*, 2017)، آزمون تولید گاز از گلوکز در محیط‌کشت MRS براث حاوی لوله دورهام و گلوکز به روش (Ahn *et al.*, 2017)، آزمون توانایی رشد سویه‌های اسید لاکتیک در pH های (۲، ۴ و ۶/۵ تنظیم شده با اسید کلریدریک یک مولار)، آزمایش رشد در دماهای مختلف (۱۵ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد) و توانایی رشد در غلظت‌های مختلف نمک (۲، ۴ و ۶/۵ درصد) به روش (Ebrahimi *et al.*, 2016) انجام شد. آزمون تخمیر کربوهیدرات‌ها، با استفاده از محیط کشت پایه MRS براث بدون گلوکز و عصاره گوشت گاو[2] با غلظت کلروفنل رد ۰/۰۰۴ درصد تهیه و پس از انجام آزمایش، نتایج تخمیر کربوهیدرات‌ها با جدول استاندارد برگی مقایسه شد. قندهای ساکارز، گلوکز، لاکتوز، آرابینوز، مانیتول، زایلوز، گالاکتوز، مالتوز و فروکتوز مورد استفاده قرار گرفتند (Ebrahimi *et al.*, 2016).

انگشت نگاری ژنومی (RAPD)[3]

1- De Man, Rogosa and Sharpe

2- Beef extract

3- Random amplification of polymorphic DNA

این آزمون بر اساس توالی‌های تکراری ژنومی با استفاده از تکنیک RAPD انجام گردید. جهت تکثیر ژنوم جدایه‌ها، از پرایمر GTG (M13) تهیه شده از شرکت سیناکلون استفاده و محصول واکنش بر روی الکتروفورز با ژل ۱/۵ درصد تفکیک و در زیر دستگاه ژلداک مشاهده گردید بهینه سازی واکنش در حجم کلی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر از مستر میکس آماده 2X آمپلیکون (دنازیست)، ۱/۵ میکرولیتر پرایمر GTG- M13 (دنازیست) و ۱/۵ میکرولیتر DNA هدف در دستگاه ترموسایکلر (BIO- RAD، U.S.A) انجام گردید (Tafvizi *et al.*, 2012).

آنالیز پروفایل‌های باندی حاصل از rep – PCR

بعد از بدست آمدن پروفایل‌های باندی برای هر گونه، وجود یا عدم وجود باند در هر ردیف با کدهای یک و صفر (کدهای اسکی یا binary) درنرم‌افزار Excel مشخص گردید و سپس با انتقال این کدها و اعداد از نرم‌افزار Excel به نرم‌افزار MVSP ver.3.1[1]، میزان شباهت الگوها با استفاده از ضریب Simple Matching Coefficient بیان گردید (Tafvizi *et al.*, 2012).

شناسایی تکمیلی باکتری‌های LAB بر مبنای آنالیز توالی قطعه ۱۶S rDNA (PCR)

توالی‌یابی و شناسایی دقیق ایزوله‌ها به روش مولکولی و تکثیر ژن ۱۶S rRNA که بر اساس نواحی محافظت شده این ژن عمل می‌کند، انجام گردید. واکنش در یک مخلوط ۲۰ میکرولیتری در دستگاه ترموسایکلر (BIO- RAD، آمریکا) با استفاده از پرایمرهای عمومی F: P8FPL با توالی AGTTTGATCCTGGCTCAG و R: p8806R با توالی GGACTACCAGGGTATCTAAT انجام شد (Ferchichi *et al*., 2007). بعد از انجام PCR و مشاهده الگوی باندی مناسب در الکتروفورز محصولات PCR برای توالی‌یابی به شرکت ژن فن آوران (تهران) ارسال شدند، توالی‌یابی به وسیله Cycle extention در دستگاه توالی‌کننده API 373 DNA Sequencer (آمریکا) با استفاده از پرایمر پیشرو P8FPL انجام و توالی‌های بدست آمده با توالی‌های اطلاعاتی موجود در Gen Bank با کمک برنامه Blast در پایگاه NCBI به آدرس http:/www.ncbi.nlm.nih.gov مقایسه گردید (Cotter *et al*., 2012).

درخت فیلوژنتیکی

درخت فیلوژنتیکی با استفاده از توالی‌های جدایه‌ها و توالی سویه های مرجع از NCBI به دست آمد بر اساس روش آماری neighbor – joining و با نرخ خود راه انداز ۱۰۰۰[2] تکرار رسم و از *اشریشیا کلی* به‌عنوان برون از گروه[3] استفاده گردید. این درخت موقعیت فیلوژنتیکی جدایه‌های بدست آمده از نمونه‌های نام برده شده در قسمت جمع‌آوری نمونه را نسبت به هم نشان می‌دهد (Schliep, 2011).

خالص‌سازی نسبی باکتریوسین

پس از تلقیح جدایه‌ها در محیط کشت MRS براث، به مدت ۴۸ ساعت در گرمخانه ۳۵ درجه‌سانتی‌گراد قرار داده شدند. به منظور کاهش فعالیت مهاری اسیدهای آلی تولید شده در محیط، سوپرناتانت عاری از سلول به کمک سود ۱۰N، خنثی و در محدوده pH = ۶/۵–۷ تنظیم گردید. برای خنثی شدن اثر آب اکسیژنه، آنزیم کاتالاز با غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به سوپرناتانت عاری از سلول اضافه شد. ترکیبات باکتریوسینی با استفاده از سولفات آمونیوم ۷۵ درصد ترسیب داده شده و ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای رسوب دهی بیشتر باکتریوسین همگن شد. در مرحله بعد یک ساعت با دور ۲۳۰۰۰*g* در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید، به رسوب حاصله بافر فسفات پتاسیم با pH = ۷ به نسبت ۱:۱ و محلول متانول– کلروفرم به نسبت ۲ به ۱ باکتریوسین ته نشین شده اضافه و بعد از یک ساعت سانتریفیوژ با تنظیمات قبلی، در آب دو بار تقطیر استریل حل و دوباره سانتریفیوژ گردید (Shokri *et al.*, 2013).

سنجش تیتر یا عیار باکتریوسین خام

این آزمایش با استفاده از روش کریتیکال[4] انجام گرفت، بدین ترتیب که بعد از تهیه محیطهای کشت MRS براث و تلقیح جدایه‌ها در آن، به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه‌سانتی‌گراد گرمخانه- گذاری شدند، به منظور کاهش فعالیت مهاری اسیدهای آلی تولید شده توسط سویه‌های اسیدلاکتیک، pH سوپرناتانت به کمک سود ۱۰N، خنثی و در محدوده ۶/۵– ۷ تنظیم گردید. برای خنثی شدن اثر آب اکسیژنه، از آنزیم کاتالاز به غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به سوپرناتانت عاری از سلول اضافه شد و به مدت ۴۸ ساعت در دستگاه فریز درایر R-114 / Operon (Korea) جهت تغلیظ قرار گرفت. درون میکروتیوپ‌های استریل از سوپرناتانت تغلیظ شده رقت $۱۰^{-۱}$ تا $۱۰^{-۱۲}$ تهیه گردید و بعد از کشت چمنی سویه‌های شاخص در محیط MHA، با رقت نیم مک فارلند، چاهک‌ها ایجاد شدند. بعد از

1- MultiVariate Statistical Package

2- Bootstrap
3- Outgroup
4- Critical Method

بارگذاری ۸۰ میکرولیتر از هر رقت درون چاهک‌ها، جهت انتشار بهتر، پلیت‌ها به مدت نیم ساعت در یخچال قرارگرفته و بعد از ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، از نظر هاله عدم رشد بررسی و با فرمول زیر محاسبه شدند (Ashari *et al*., 2019)

$$AU/mL = ۲^n \ (۱۰۰۰ \div ۸۰) \qquad (۱)$$

n: شماره آخرین چاهکی است که هاله رویت می‌گردد.

بررسی اثر حرارت، زمان و pH بر فعالیت باکتریوسین تولیدی

باکتریوسین‌های خالص شده از سویه‌های مختلف در معرض تیمار حرارتی ۶۰ و ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند، سپس از نظر ویژگی بازدارندگی بررسی شدند (Udhayashree *et al*., 2012).

جهت بررسی اثر مدت زمان نگهداری باکتریوسین استحصال شده در دمای ۴ و ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ماه تحت شرایط استریل در یخچال و فریزر نگهداری و از نظر ویژگی بازدارندگی بررسی شدند (Udhayashree *et al*., 2012).

به‌منظور بررسی اثر pH، باکتریوسین‌های خالص شده از سویه های مختلف با استفاده از NaOH و HCl ۵ مولار در معرض pH-های مختلف (۱۰-۲) قرار گرفتند و بعد از ۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای اتاق به pH = ۷ تنظیم و از نظر ویژگی بازدارندگی با آزمایش چاهک‌گذاری در محیط مولر هینتون آگار بررسی شدند (Udhayashree *et al*., 2012).

مقایسه باکتریوسین‌های استخراج شده با نایسین تجاری با آزمون MIC[1] و MBC[2]

نایسین تجاری Niseen – S (Siveele)، با غلظت ppm ۱۰۰۰۰۰ در اسیدکلریدریک ۰/۰۲ نرمال تهیه و با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری استریل شد، غلظت‌های ppm ۵۰۰۰۰، ۲۵۰۰۰، ۱۲۵۰۰، ۶۲۵۰ و ۳۱۲۵ با استفاده از آب مقطر استریل آماده گردید (Ashari *et al*., 2019) و با رقت‌های مختلف تهیه شده از باکتریوسین‌های نیمه خالص شده که همانند روش آماده سازی نایسین تهیه شده بودند، از نظر حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و کشندگی (MBC) در میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی استریل و با روش میکرودایلوشن براث مورد مقایسه قرار گرفتند، ابتدا ۱۰۰μl محیط کشت مولر هینتون براث در هر یک از چاهک‌ها توزین و از رقت‌های مختلف تهیه شده از باکتریوسین به حجم ۱۰۰ μl به چاهک‌ها اضافه و معادل کدورت نیم مک فارلند باکتری به تمامی چاهک‌ها به استثنای چاهک کنترل منفی (حاوی باکتریوسین و محیط کشت) اضافه گردید، بعد از ۳۰ ثانیه یکنواخت سازی روی شیکر جذب نوری با استفاده از دستگاه الایزاریدر (chromTech، آلمان) در ساعت صفر و در طول موج ۶۲۰ نانومتر خوانده شد و بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه-گذاری در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد مجددا با دستگاه الایزاریدر میزان کدورت خوانده شد. کمترین غلظتی که کدورت نداشت و رشد باکتری در آن مشاهده نشد بعنوان MIC گزارش گردید. جهت انجام تست MBC که بیانگر حداقل غلظت کشندگی هست از چاهک‌های فاقد کدورت (غلظت MIC و بیشتر از آن) مقدار ۱۰ میکرولیتر بر روی محیط کشت مولرهینتون آگار تلقیح شده با شاخص‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* با رقت $۱۰^۶$، کشت داده شد، بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، کمترین رقتی که ۹۹/۹ درصد باکتری‌ها را از بین برده بود به عنوان رقت MBC در نظر گرفته شد (Thomas and Delves-Broughton, 2005).

آنالیز آماری

تمامی آزمون‌ها به غیر از شناسایی مولکولی میکروارگانیسم‌ها، در سه تکرار در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شده است. تجزیه و تحلیل داده‌ها (ANOVA) با استفاده از مدل (۲F1) نرم افزار آماری SPSS (ویرایش ۱۶) در سطح احتمال ۹۵ درصد ($p<۰/۰۵$) و آزمون توکی (tukey) برای تایید وجود اختلاف بین میانگین‌ها انجام گرفت (Miraei Ashtiani *et al*., 2022).

نتایج و بحث

جمع‌آوری نمونه و جداسازی سویه‌ها

در این بررسی از فراورده‌های تخمیری کمتر شناخته شده بر پایه میوه شامل ترشی مخلوط میوه‌های به و سیب ترش، فراورده تخمیری زالزالک، ترشی انبه و ترشی ازگیل که بجز انبه بقیه محصولات بومی ایران و از استان‌های مختلف تهیه شده بودند، استفاده گردید، در مجموع ۱۶۲ جدایه اسید لاکتیک پس از انجام آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی شناسایی شدند که در مقایسه با جدول برگی ۷۰٪ از گروه *لاکتوباسیلوس‌های* هتروفرمانتاتیو اختیاری و به‌عنوان *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* و ۱۰٪ جدایه‌ها از گروه *لاکتوباسیلوس‌های* هوموفرمانتاتیو اختیاری- اجباری به عنوان *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و ۱۰٪ جدایه‌ها بصورت ناشناخته باقی ماندند. از بین سویه‌های شناخته شده، جدایه‌های با کدهای Ab- جدا شده از ترشی ازگیل، Sa- از فراورده تخمیری زالزالک، S6- از ترشی انبه و A۱۰-

1- Minimum Inhibitory Concentration
2- Minimum Bactericidal Concentration

جدا شده از ترشی مخلوط میوه حاوی به و سیب ترش، به‌عنوان سویه‌های با بیشترین مقدار باکتریوسین و قوی‌ترین ویژگی بازدارنده از رشد سویه بیماری‌زا، انتخاب و مورد آنالیزهای بعدی قرار گرفتند.

نتایج آزمایش‌های فنوتیپی، فیزیولوژی و بیوشیمیایی جهت شناسایی جدایه‌ها

تولید گاز از گلوکز

نتایج آزمون‌های فنوتیپی و فیزیولوژیکی به همراه آزمون تولید گاز از گلوکز برای هر ۴ جدایه انتخاب شده از فراورده‌های مختلف در جدول ۱، آورده شده است. آزمون تولید گاز از گلوکز نشان دهنده همو و هترو فرمانتاتیو بودن باکتری است. باکتری‌های هتروفرمانتاتیو علاوه بر داشتن آنزیم آلدولازی دارای آنزیم فسفوکتولازی نیز هستند که به آن‌ها اجازه می‌دهد پنتوزها را به لاکتات و استات تبدیل و گاز CO_2، اسید و الکل تولیدکنند (Ebrahimi *et al.*, 2016)، نتایج نشان داد جدایه‌ها جزء گروه لاکتوباسیلوس‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی هستند و جدایه‌های ۱۰A، Ab و سویه کنترل در ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری از نظر تولید گاز مثبت و هتروفرمانتاتیو بودند.

جدول ۱- ویژگی‌های مورفولوژی و فنوتیپی جدایه‌های حاصل از فراورده‌های تخمیری بر پایه میوه

Table 1- Morphological and phenotypic characteristics of isolates obtained from fruit-based fermented products

شکل کلنی (Colony form)	مورفولوژی (Morphology)	گرم (Gram)	کاتالاز (Catalase)	ایندول (Indole)	تولید گاز از گلوکز (Gas production from glucose)	محصول (Product)	جدایه (Isolate)
کنگره دار (Crenate)	باسیلی (Rod)	+	−	−	+	ترشی مخلوط میوه حاوی به و سیب ترش (Pickled mixed fruit containing quince and sour apple)	10A
دیواره صاف (Smooth wall)	باسیلی (Rod)	+	−	−	−	انبه تخمیری (Fermented mango)	S6
دیواره صاف (Smooth wall)	باسیلی (Rod)	+	−	−	−/+	زالزالک تخمیری (Fermented hawthorn)	Sa
کلنی مقعر (Concave colony)	باسیلی (Rod)	+	−	−	+	ازگیل تخمیری (Fermented medlar)	Ab

10A:*لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه ۳۳۶۰؛ V3: *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه Heal 19؛ S6: *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه ۷۲۳۲؛ Ab: *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه Lan4.

10A: L. plantarum strain 3360; V3 L. plantarum strain Heal 19; S6: L. plantarum strain 7232; Sa: L. plantarum strain lb51; Ab: L. plantarum strain Lan4..

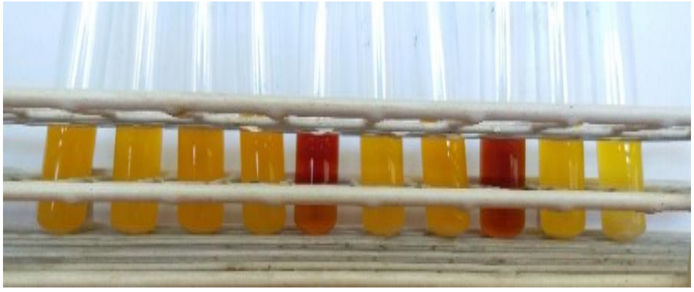
تخمیر کربوهیدرات‌ها

نتایج این بررسی روی کربوهیدرات‌های گلوکز، ساکارز، لاکتوز، آرابینوز، مانیتول، زایلوز، گالاکتوز، مالتوز و فروکتوز نشان داد، هر چهار جدایه کربوهیدرات‌های مانیتول، گلوکز و ساکارز را که قندهای مونو ساکاریدی و آلدوهگزوز هستند، بهتر از قندهای زایلوز و آرابینوز که مونو ساکاریدی و آلدو پنتوز هستند، تخمیر کرده و افشره سلولی بیشتری تشکیل می‌دهند. سویه‌های جدا شده در محیط‌های حاوی قندهای زایلوز و آرابینوز هیچگونه تغییر رنگی ایجاد نکردند (شکل ۱، جدول ۲). نتایج این پژوهش با نتایج حاصل از بررسی گروسو-تودور و زمفیر (Grosu-Tudor and Zamfir, 2011) در خصوص جداسازی و شناسایی مولکولی سویه‌های اسیدلاکتیک از سبزیجات تخمیری بومی رومانی و نتایج حاصل از زتاوسکا و همکاران (Szutowska *et al.*, 2021) در رابطه با جداسازی باکتری اسید لاکتیک از کلم پیچ تخمیری همخوانی نزدیکی داشت.

توانایی رشد در دماهای مختلف

هر چهار سویه تولیدکننده باکتریوسین در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد قادر به رشد در مدت زمان کمتری (۲۴ ساعت) نسبت به دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد (۷۲ ساعت) بودند. با توجه به نتایج (جدول ۳)، جدایه‌ها در دماهای پایین‌تر به مدت زمان بیشتری برای رشد نیاز داشته و کلنی‌های ریزتری را تشکیل دادند و شاید این موضوع یکی از علل تخمیر طولانی مدت در فراورده‌های تخمیری، جهت رسیدن به طعم و بوی مطلوب، رشد و آداپتاسیون دیر هنگام باکتری‌های اسید لاکتیک در دمای پایین باشد. نتایج این بررسی با نتایج ابراهیمی و

همکاران (Ebrahimi et al., 2016) جداسازی و شناسایی مولکولی *لاکتوباسیلوس برویس* از سرکه بومی و بررسی کاظمی پور و همکاران (Kazemipoor *et al.*, 2012) جداسازی سویه‌های اسیدلاکتیک از سبزیجات تخمیری همخوانی داشت.



شکل ۱- تخمیر قندهای مختلف توسط جدایه‌ها (لوله‌های قرمز رنگ عدم تخمیر قند زایلوز و آرابینوز)

Fig. 1- fermentation of different sugars by the isolates (red colored tubes of non-fermentation of xylose and arabinose sugars)

جدول ۲- تخمیر کربوهیدرات‌های مختلف توسط سویه‌های تولیدکننده باکتریوسین

Table 2- Fermentation results of different carbohydrates by bacteriocin-producing strains

جدایه Isolate	فروکتوز Fructose	مالتوز Maltose	گالاکتوز Galactose	زایلوز Xylose	مانیتول Mannitol	آرابینوز Arabinose	لاکتوز Lactose	گلوکز Glucose	ساکارز Sucrose
10A	+	+	+	−	+	−	+	+	+
S6	+	+	+	−	+	−	+	+	+
Ab	+	+	+	−	+	+/−	+	+	+
Sa	+	+	+	−	+	−	+	+	+
Ctr	+	+	+	−	+	−	+	+	+

10A:(-)*لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه ۳۳۶۰؛ V3: *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه Heal 19؛ S6: *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه ۷۲۳۲؛ Ab: *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه Lan4، Ctr: کنترل.

10A: *L. plantarum* strain 3360; V3 *L. plantarum* strain Heal 19; S6: *L. plantarum* strain 7232; Sa: *L. plantarum* strain lb51; Ab: *L. plantarum* strain Lan4; Ctr: Control.

عدم تخمیر قند، (+) انجام تخمیر، (+/−) تخمیر خیلی کم

no sugar fermentation, (+) fermentation, (-/+) very little fermentation(−)

توانایی رشد در غلظت‌های مختلف نمک

نمک به‌عنوان یک فاکتور موثر برای ممانعت از رشد میکروارگانیسم های ایجاد کننده فساد که مقاوم به نمک نیستند و رشد سویه‌های اسیدلاکتیک در فراورده‌های تخمیری است. بر طبق نتایج حاصل از پژوهش علی‌زاده و همکاران (Alizadeh *et al.*, 2010) در این فراورده‌ها افزودن نمک در غلظت ۴ درصد، باعث افزایش جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک به مقدار ۱۰^۹ CFU[1]/mL شده و با افزایش مقدار نمک به بیشتر از ۵ درصد، کاهش نیم لگاریتمی در جمعیت میکروبی صورت می‌گیرد. از دیگرسو با توجه به گزارشات پرسولسی و همکاران (Persulessy *et al.*, 2020) سطح بالای نمک باعث مرگ میکروارگانیسم‌های ایجاد کننده فساد می‌شود که در برابر نمک مقاوم نیستند، این شرایط انتخابی زمینه رشد برای میکروارگانیسم‌های مقاوم در برابر نمک از جمله باکتری‌های اسید لاکتیک را فراهم می‌آورد. در شرایط خاص، نمک افزوده شده با ایجاد فشار اسمزی بالا و کاهش فعالیت آبی به‌عنوان یک نگهدارنده عمل می‌کند و در نهایت باعث حذف سویه‌های رقیب می‌شود (Miraei Ashtiani *et al.*, 2023;Persulessy *et al.*, 2020). بنابر این فعالیت باکتری‌های اسیدلاکتیک باعث رسیدن سریعتر فراورده‌های تخمیری نسبت به حالت کنترل (نمونه‌های بدون نمک) می‌گردد. با توجه به نتایج (جدول ۳) در محتوای نمک ۲ و ۴ درصد هر چهار جدایه در محیط کشت MRS براث کدورت تشکیل دادند تشکیل کدورت و پالیده ته نشست میکروبی (افشره) در نمونه Sa در محتوای نمک ۶/۵ درصد ضعیف‌تر از دیگر جدایه‌ها بود. در این آزمایش محتوای نمک ۴ درصد محیط مناسبی برای رشد باکتری‌های اسید لاکتیک شناسایی شد. نتایج این بررسی با نتایج ابراهیمی و همکاران (Ebrahimi *et al.*, 2016) در مورد جداسازی و شناسایی

1- colony-forming unit

مولکولی *لاکتوباسیلوس برویس* از سرکه بومی، و نتایج علی‌زاده و همکاران (Alizadeh *et al.*, 2010) تاثیر نمک بر رشد و ویژگی ضدمیکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از خمیر ترش نان های سنتی و بررسی کاظمی پور و همکاران (Kazemipoor *et al.*, 2012) جداسازی سویه‌های اسیدلاکتیک از سبزیجات تخمیری و بررسی گروسو-تودور و زمفیر (Grosu-Tudor and Zamfir, 2011) جداسازی و شناسایی مولکولی سویه‌های اسیدلاکتیک از سبزیجات تخمیری بومی رومانی همخوانی نزدیکی را نشان می‌دهد.

توانایی رشد در pHهای مختلف

با توجه به نتایج (جدول ۳) هیچ یک از جدایه‌های مورد آزمایش در pH =۲ رشدی نداشت ولی تقریبا تمامی جدایه‌ها در محدوده pH =۴-۶/۵ رشد خوبی از خود نشان دادند که این یکی از ویژگی های باکتری‌های اسیدلاکتیک و تخمیر فراورده‌های تخمیری به کمک آن‌ها به شمار می‌رود. جدایه Sa بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری فقط در محیط نزدیک خنثی رشد نسبتا مناسبی در مقایسه با سایر جدایه‌ها داشت. نتایج این بررسی با نتایج حاصل از پژوهش علیزاده بهبهانی و همکاران (Alizadeh Behbahani *et al.*, 2021) ارزیابی فعالیت باکتریوسین حاصل از باکتری‌های لاکتوباسیل جداشده از ماست محلی بهبهان و نتایج ابراهیمی و همکاران (Ebrahimi *et al.*, 2016) جداسازی سویه‌های اسیدلاکتیک از سرکه و نتایج حوانهلم و همکاران (Hwanhlem *et al.*, 2017) جداسازی سویه های اسید لاکتیک از روده جوجه و بررسی رشد سویه‌های لاکتوباسیل در pH مناسب همخوانی داشت.

با توجه به نتایج بدست آمده از آنالیزهای فنوتیپی، فیزیولوژی و بیوشیمیایی از مجموع ۱۶۲ جدایه اسید لاکتیک پنج جدایه به‌عنوان سویه‌های با بیشترین و قوی‌ترین ویژگی بازدارنده از رشد سویه‌های بیماری‌زا، انتخاب و مورد آنالیزهای بعدی قرار گرفتند. در مقایسه با جدول برگی ۷۰٪ از سویه‌های جدا شده جزء گروه *لاکتوباسیلوس‌های* هتروفرمانتاتیو اختیاری و به‌عنوان *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* و ۱۰٪ جدایه‌ها از گروه *لاکتوباسیلوس‌های* هوموفرمانتاتیو اختیاری-اجباری به عنوان *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و ۱۰٪ جدایه‌ها بصورت ناشناخته باقی ماندند. از بین سویه‌های شناخته شده، جدایه های با کدهای Ab- جدا شده از ترشی ازگیل، Sa- از فراورده تخمیری زالزالک، S6- از ترشی انبه و ۱۰A- جدا شده از ترشی مخلوط میوه حاوی به و سیب ترش جهت شناسایی انتخاب و در مرحله بعد توالی یابی شدند.

جدول ۳- تاثیر دمای ۱۵ و ٤٥ درجه سانتی‌گراد در مدت زمان ٢٤ و ٧٢ ساعت، غلظت‌های مختلف نمک و pH بر رشد جدایه‌ها

Table 3- Effect of temperature of 15°C and 45°C in 24 and 72 hours, different concentrations of salt and pH on the isolates growth

	متغیر (Variable)									
جدایه (Isolate)	24 h 15°C	72 h 15°C	24 h 45°C	72 h 45°C	2% نمک	4% نمک	نمک 6.5%	=2 pH	=٤ pH	=6.5 pH
S6	–	–	+	+	+	++	+	–	+	+
10A	–	+	+	+	+	++	+	–	+	+
Ab	–	+	+	+	+	++	+	–	+	+
Sa	–	+	–	+	+	++	+ ضعیف (Weak+)	–	+/–	+
Ctr	–	+	+	+	+	++	+	–	+	+

10A:(-) *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه ۳۳۶۰؛ V3: *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه Heal 19؛ S6: *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه ۷۲۳۲؛ Ab: *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه Lan4، Ctr: کنترل.

10A: *L. plantarum* strain 3360; V3 *L. plantarum* strain Heal 19; S6: *L. plantarum* strain 7232; Sa: *L. plantarum* strain lb51; Ab: *L. plantarum* strain Lan4; Ctr: Control.

(–) عدم رشد، (+) رشد مناسب، (+/–) رشد ضعیف، (+ +) رشد خوب با تولید باکتریوسین بیشتر

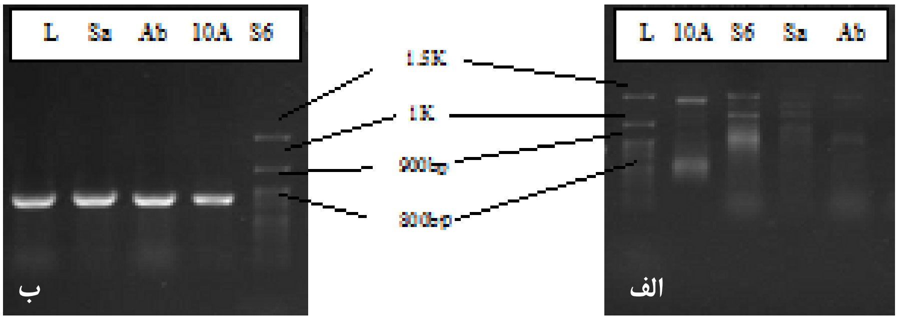
no growth, (+) good growth, (-/+) poor growth, (+ +) good growth with more bacteriocin production(–)

انگشت‌نگاری ژنومی و الکتروفورز

این روش جهت شناسایی باکتری‌ها در سطح سویه یک ابزار دقیق و قابل اطمینان است. در این بررسی استخراج DNA به روش CTAB[1] انجام شد، با اندکی تغییرات در روند استخراج و استفاده همزمان از دو آنزیم لیزوزیم و پروتئیناز K استخراج بهتری صورت

1- Cetyltrimethylammonium bromide

گرفت چرا که شکستن دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت و خروج بیشتر DNA را به‌همراه داشت. بعد از انجام PCR و الکتروفورز DNA استخراج شده زیر نور UV با مارکر ۱۰۰bp (سیناکلون) مقایسه باندها صورت گرفت، باندها در نواحی ۸۰۰ bp مشاهده شدند. تصویر انگشت نگاری ژنومی (شکل ۲، الف) که از ژل آگارز یک و نیم درصد بدست آمده است میزان تفاوت در بین جدایه‌ها را نشان می‌دهد و با توجه به شکل ۲، ب باندهای مشخص برای هر ۴ جدایه در ناحیه ۸۰۰ bp، نشان دهنده میزان شباهت میان گونه‌ای است. نتایج این بررسی با نتیجه آزمون فرچیچی و همکاران (Ferchichi *et al.*, 2007) شناسایی مولکولی سویه‌های اسیدلاکتیک جدا شده از شیر بز و شناسایی سویه‌های اسید لاکتیک در نواحی ۷۳۳bp برای سویه‌های مختلف *انتروکوکوس* همخوانی نزدیکی داشت.



شکل ۲– الف. انگشت نگاری ژنومی، ب. نمایش محصول PCR (قطعه ۸۰۰ bp) حاصل از تکثیر ژن 16s rRNA

Fig. 2- a. Genomic fingerprinting, b. Showing the PCR product (800 bp fragment) resulting from the amplification of 16s rRNA gene

توالی‌یابی

با توجه به جدول ۴، نتایج حاصل از توالی‌یابی مشخص کننده غالب بودن سویه *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* در فراورده‌های تخمیری بر پایه میوه بود. بعد از شناسایی جمعیت لاکتیکی فراورده های تخمیری نتیجه حاصل از آزمون مولکولی با پیش‌بینی این مطالعه از جمعیت میکروبی ذاتی فراورده‌های تخمیری بر پایه میوه و نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی تا حدودی مطابقت داشت. در این مطالعه انتظار بر غالب بودن گونه *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* بود چرا که طبق نتایج هو و همکاران (Hu *et al.*, 2013) در مورد جداسازی سویه‌های غالب فراورده‌های سبزی و میوه، *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* به‌عنوان سویه غالب فراورده‌های تخمیری گیاهی بر پایه میوه و سبزی شناخته شده است، که با یافته‌های پژوهش‌های حاضر همخوانی داشت.

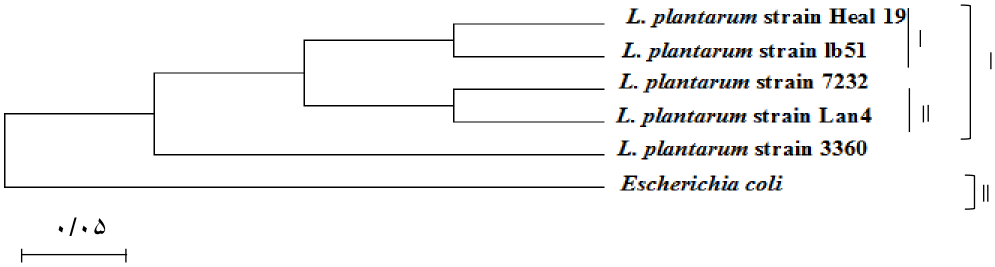
جدول ٤- نتایج توالی یابی 16S rDNA جدایه‌های حاصل از فراورده‌های تخمیری میوه

Table 4- The results of 16S rDNA sequencing of isolates obtained from fermented fruit products

کد جدایه (Isolate code)	شماره ثبت (Accession number)	درصد شباهت در NCBI (% ID in NCBI)	اسامی سویه‌های جدا شده (Name of bacteria)
10A	MT613643/1	96.42%	*لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم سویه 3360* (*Lactiplantibacillus plantarum strain 3360*)
S6	MT645503/1	98.75%	*لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم سویه 7232* (*Lactiplantibacillus plantarum strain* 7232)
Sa	LT853604/1	99.58%	*لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم سویه Lan4* *Lactiplantibacillus plantarum strain* Lan4
Ab	AY590774/1	98.92%	*لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم سویه lb51*

ترسیم درخت فیلوژنتیکی (دندوگرام)

به طور کلی درخت رسم شده (شکل ۳) شامل دو خوشه است، خوشه اول از دو زیر خوشه تشکیل شده که در هر زیر خوشه دو سویه متفاوت از *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* واقع شده‌اند، در زیر خوشه اول *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* سویه ۱۹ Heal و *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* سویه ۵۱ lb و در زیر خوشه دوم *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* سویه ۷۲۳۲ و Lan۴ و در خوشه دوم *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* سویه ۳۳۶۰ قرار دارند. در دندوگرام رسم شده از ژن 16s rRNA *اشریشیا کلی* به عنوان سویه خارج از گروه استفاده شده است.



شکل ۳- ترسیم درخت فیلوژنتیکی با مقایسه ژن 16S rRNA با استفاده از نرم افزار مگا ۷

Fig. 3- Drawing a phylogenetic tree by comparing 16S rRNA gene using Mega 7 software

بررسی هاله بازدارندگی با روش چاهک‌گذاری

با توجه به نتایج جدول ۵ و شکل ۴، هر چهار سویه منتخب هاله‌هایی بسیار شفاف در حضور سویه‌های بیماری‌زا با رقت 10^8 تشکیل دادند. در این بررسی سویه Lan ۴ و ۷۲۳۲ در مقایسه با دو جدایه دیگر، نقاط بازدارنده از رشد بزرگتری را در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* تشکیل دادند. نقاط بازدارنده از رشد در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر از *سالمونلا تایفی* و آن هم بزرگتر از *اشریشیا کلی* گزارش گردید، که این بازدارندگی در سطح احتمال ($p<0.05$) معنی دار بود. این آزمون نشان دهنده موثر بودن باکتریوسین باکتری‌های اسیدلاکتیک بر میکروارگانیسم‌های هم نوع خود بیشتر از باکتری‌های گرم منفی و تاثیر معنی‌دار آن در سطح احتمال ($p<0.05$) بر باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با تیمار کنترل (نایسین تجاری) بود. در مقایسه با نایسین تجاری هر چهار باکتریوسین استخراج شده در برابر هر چهار سویه شاخص از نظر قطر هاله‌های عدم رشد در سطح احتمال ($p<0.05$) تفاوت معنی داری داشتند. نتایج گزارش شده در این آزمایش با نتایج جداسازی پلانتارسین از *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* SR18 ال شانی و همکاران (El-Shouny *et al.*, 2020)، پژوهش شهیدی و همکاران (Shahidi *et al.*, 2014) کاربرد فیلم ضدمیکروبی جهت مهار *لیستریا مونوسایتوجنز* در گوشت، پژوهش عبدالهزاده و همکاران (Abdollahzadeh *et al.*, 2012) در مورد تاثیر نایسین و آویشن شیرازی بر جمعیت *لیستریا مونوسایتوجنز* در گوشت چرخ شده و بررسی‌های بنچ و همکاران (Benech *et al.*, 2002) تاثیر نایسین Z بر زمان ماندگاری فیله ماهی و پژوهش علیرضالو و همکاران (Alirezalu *et al.*, 2020) تاثیر نایسین بر مدت زمان نگهداری سوسیس فرانکفورتر نتایج پژوهش شکری و همکاران (Shokri *et al.*, 2013) در مورد تاثیر باکتریوسین استخراج شده از *انتروکوکوس فاسیوم* DSH20 بر سویه‌های مختلف *لیستریا مونوسایتوجنز*، نتایج شیانگ و همکاران (Xiang *et al.*, 2021) در مورد جداسازی باکتریوسین حاصل از جدایه‌های بدست آمده از زغال اخته و نتایج پژوهش هو و همکاران (Hu *et al.*, 2013) جداسازی و شناسایی پلانتارسین ۱۶۳ از سبزی تخمیری چینی و ویژگی ضد *لیستریایی* آن همخوانی داشت. برای تایید ماهیت پروتئینی ترکیبات جدا شده، اثر آنزیم‌های پروتئازی، کیموتریپسین، لیزوزیم، پپسین و پروتئیناز K روی آن‌ها بررسی شد و با از بین رفتن هاله عدم رشد که نشان دهنده ماهیت پروتئینی ترکیبات جدا شده (باکتریوسین) بود بر آزمون چاهک گذاری صحه گذاشته شد (نتایج آزمون اثر آنزیم‌ها ارائه نشده است).

سنجش تیتر یا عیار باکتریوسین

در تمامی باکتریوسین‌ها بالاترین رقتی که فعالیت بازدارندگی را در برابر سویه‌های شاخص *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* نشان داد به‌عنوان تیتر و یا عیار باکتریوسین و با واحد AU/ml[1] معرفی شد. با توجه به جدول ۶ تمامی باکتریوسین‌های استخراج شده در این بررسی فعالیت بیشتری نسبت به آنچه در مطالعات آشاری و همکاران (Ashari *et al.*, 2019) بررسی حداقل مقدار کشندگی نایسین و مطالعات ال شانی و همکاران (El-Shouny *et al.*, 2020) در مورد پلانتارسین SR18 با فعالیت ۲۵۶۰۰ AU/ml استخراج شده از *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* جدا شده از ماست گزارش شده بود، نشان دادند. باکتریوسین حاصل از جدایه ۱۰A و Ab با مقدار فعالیت ۶۴۰۰۰AU/ml به‌عنوان قویترین باکتریوسین در سنجش عیار باکتریوسین در مقایسه با نایسین تجاری (Siveele) محسوب می‌گردد هر چند که از نظر اندازه قطر هاله عدم رشد، جدایه ۱۰A بیشترین مقدار را در مقایسه با سایر باکتریوسین‌های مورد آزمایش حتی با فعالیت یکسان نشان داد.

1- Arbitrary Unit per millilitter

جدول ۵- قطر هاله عدم رشد (میلی متر) باکتریوسین‌های استخراج شده مختلف علیه بیماری‌زاهای گرم مثبت و منفی

Table 5- Diameter of Inhibition zone (mm) of different extracted bacteriocins against Gram positive and Gram negative pathogens

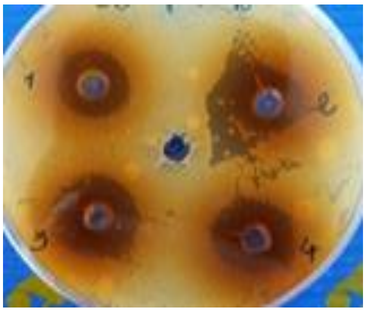
باکتریوسین (Bacteriocin)	میکرو اورگانیسم شاخص (Indicator microorganisms)			
	استافیلوکوکوس اورئوس *(Staphylococcus aureus)* **ATCC 25922** **10^8 CFU/mL**	*اشریشیا کلی* *(Escherichia coli)* **ATCC 25923** **10^8 CFU/mL**	*سالمونلا تایفی‌موریوم* *(Salmonella typhimuriyum)* **PTCC 1609** **10^8 CFU/mL**	*لیستریا مونوسایتوجنز* *(Listeria monocytogenes)* **PTCC1165** **10^8 CFU/mL**
b10A	21^{aA}	16^{aD}	18^{aC}	19^{aB}
bS6	19^{abcA}	12^{abcD}	18^{abcC}	18^{abcB}
bSa	18^{bcA}	15^{bcD}	16^{bcC}	19^{bcB}
bAb	20^{abA}	13^{abD}	17^{abC}	17^{abB}
نایسین (Nisin)	18^{cA}	13^{cD}	16^{cC}	17^{cB}

b: باکتریوسین؛ 10A:*لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه ۳۳۶۰؛ V3: *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه Heal 19؛ S6: *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه ۷۲۳۲؛ Ab: *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه Lan4.

نتایج به صورت میانگین سه تکرار بیان شد. اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) نمی‌باشند. اعداد با حروف مشترک در هر ردیف دارای اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) نمی‌باشند.

b: bacteriocin; 10A: *L. plantarum* strain 3360; V3 *L. plantarum* strain Heal 19; S6: *L. plantarum* strain 7232; Sa: *L. plantarum* strain lb51; Ab: *L. plantarum* strain Lan4..

The results were expressed as the average of three repetitions. Numbers with same letters in each column do not have significant differences (p>0.05). Numbers with same letters in each row do not have a significant difference (p>0.05).



شکل ٤- نقاط بازدارنده از رشد برای هر ٤ سویه در رقت 10^8 بیماری‌زا

Fig. 4- Inhibition zones for all 4 strains in 10^8 of pathogen strain

بررسی اثر دماهای ۶۰ و ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه بر فعالیت باکتریوسین

برای تعیین پایداری اثر بازدارندگی در درجه حرارت‌های بالا، فعالیت ضدمیکروبی باکتریوسین استخراج شده از سویه‌های مختلف در دمای پاستوریزاسیون سرد و دمای استریلیزاسیون بررسی شد، با توجه به (جدول ۷) باکتریوسین‌های حاصل از جدایه‌های مختلف در برابر ۲۰ دقیقه دماهای ۶۰ و ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد فعالیت بازدارندگی خود را همچنان حفظ کردند و باعث ممانعت از رشد بیماری‌زاهای گرم مثبت و گرم منفی شدند، هر چند که در مقایسه با قبل از تیمار حرارتی، فعالیت هر چهار باکتریوسین کاهش معنی‌داری در سطح احتمال (p<۰/۰۵) داشت. بعد از تیمار حرارتی در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد جدایه ۱۰A و Ab با اندازه هاله (۱۵و ۱۴ میلی‌متر) در برابر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای بالاترین قطر هاله عدم رشد و به‌عنوان قوی‌ترین باکتریوسین‌ها گزارش شدند. بیشترین اثر بازدارندگی مربوط به باکتریوسین جدایه ۱۰A در برابر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بوده است. نتایج این بررسی با نتایج آزمون شکری و همکاران (Shokri *et al.*, 2013) در مورد تاثیر حرارت بر باکتریوسین استخراج شده از *انتروکوکوس فاسیوم* DSH20 و نتایج علیزاده بهبهانی و همکاران (Alizadeh Behbahani *et al.*, 2021) در مورد جداسازی لاکتوباسیلوس‌های مختلف مقاوم به حرارت اتوکلاو جدا شده از ماست محلی و نتایج شیانگ و همکاران (Xiang *et al.*, 2021) در مورد باکتریوسین JS17 جدا شده از باسیلوس سوبتلیس مطابقت نزدیکی داشت.

جدول ٦- عیار باکتریوسین‌های استخراج شده از سویه‌های *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* بر حسب AU/mL
Table 6- Bacteriocin titers from *Lactiplantibacillus plantarum* strains in terms of AU/mL

باکتریوسین (Bacteriocin)	میکروارگانیسم شاخص (Indicator microorganisms)	
	استافیلوکوکوس اورئوس *(Staphylococcus aureus)* ATCC 25922 10^8 CFU/mL	*اشریشیا کلی* *(Escherichia coli)* ATCC 25923 10^8 CFU/mL
b10A	64000^{aA}	64000^{aB}
bS6	32000^{bA}	32000^{bB}
bSa	32000^{bA}	32000^{bB}
bAb	64000^{aA}	64000^{aB}
نایسین (Nisin)	32000^{bA}	32000^{bB}

b: باکتریوسین؛ 10A: *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه ۳۳۶۰؛ V3: *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه Heal 19؛ S6: *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه ۷۲۳۲؛ Ab: *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه Lan4.

نتایج به صورت میانگین سه تکرار بیان شد. اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) نمی‌باشند. اعداد با حروف مشترک در هر ردیف دارای اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) نمی‌باشند.

b: bacteriocin; 10A: *L. plantarum* strain 3360; V3 *L. plantarum* strain Heal 19; S6: *L. plantarum* strain 7232; Sa: *L. plantarum* strain lb51; Ab: *L. plantarum* strain Lan4..

The results were expressed as the average of three repetitions. Numbers with same letters in each column do not have significant differences (p>0.05). Numbers with same letters in each row do not have a significant difference (p>0.05).

جدول ۷- اثر تیمار حرارتی ٦۰ و ۱۲۱ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه بر سوپرناتانت خنثی‌شده در رقت ۱۰^۸ CFU/mL بیماری‌زا
Table 7- The effect of heat treatment 60°C and 121°C for 20 minutes on the neutralized supernatant at a dilution of 10^8 CFU/mL of the pathogen

باکتریوسین (Bactericin)	میکروارگانیسم شاخص (Indicator microorganisms)					
	سالمونلا تایفی‌موریوم *(Salmonella typhimuriyum)* PTCC 1609	*اشریشیا کلی* *(Escherichia coli)* ATCC 25923	*استافیلوکوکوس اورئوس* *(Staphylococcus aureus)* ATCC 25922	*سالمونلا تایفی‌موریوم* *(Salmonella typhimuriyum)* PTCC 1609	*اشریشیا کلی* *(Escherichia coli)* ATCC 25923	*استافیلوکوکوس اورئوس* *(Staphylococcus aureus)* ATCC 25922
	60°C			121°C		
b10A	14^{aB}	13^{aB}	15^{aA}	12^{aB}	14^{aB}	15^{aA}
bS6	11^{cB}	11^{cB}	12^{cA}	11^{cB}	11^{cB}	13^{cA}
bSa	14^{bB}	14^{bB}	12^{bA}	14^{bB}	14^{bB}	12^{bA}
bAb	13^{bB}	13^{bB}	14^{bA}	14^{bB}	13^{bB}	14^{bA}
نایسین (Nisin)	11^{cB}	10^{cB}	13^{cA}	12^{cB}	11^{cB}	14^{cA}

b: باکتریوسین؛ 10A: *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه ۳۳۶۰؛ V3: *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه Heal 19؛ S6: *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه ۷۲۳۲؛ Ab: *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه Lan4.

نتایج به صورت میانگین سه تکرار بیان شد. اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) نمی‌باشند. اعداد با حروف مشترک در هر ردیف دارای اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) نمی‌باشند.

b: bacteriocin; 10A: *L. plantarum* strain 3360; V3 *L. plantarum* strain Heal 19; S6: *L. plantarum* strain 7232; Sa: *L. plantarum* strain lb51; Ab: *L. plantarum* strain Lan4..

The results were expressed as the average of three repetitions. Numbers with same letters in each column do not have significant differences (p>0.05). Numbers with same letters in each row do not have a significant difference (p>0.05).

بررسی اثر ۶ ماه نگهداری در دمای ۴ و ۲۰- درجه سانتی‌گراد بر فعالیت باکتریوسین

باکتریوسین خالص شده از تمامی سویه‌ها بعد از ۶ ماه نگهداری در دمای یخچالی ۴ و فریزری ۲۰- درجه سانتی‌گراد، در برابر بیماری‌زاهای شاخص در رقت ۱۰^۸ CFU/mL دارای نقاط بازدارنده از رشد بودند. با توجه به نتایج (جدول ۸) اثر زمان باعث کاهش ویژگی بازدارندگی تمامی باکتریوسین‌ها شد، ولی این کاهش در سطح احتمال (p<۰/۰۵) معنی‌دار نبود. جدایه ۱۰A در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* با قطر هاله ۲۱ و ۱۸ میلی‌متر بعد از ۶ ماه نگهداری در هر دو دمای دارای بالاترین ویژگی بازدارندگی بود، با توجه به نتایج (جدول ۵) و بررسی اثر بازدارندگی در زمان صفر و می‌توان باکتریوسین تخلیص شده را به مدت ۶ ماه و بیشتر در دماهای ۴ و ۲۰- درجه سانتی‌گراد بدون کاهش معنی‌دار در قدرت بازدارندگی نگهداری کرد.

جدول ۸- اثر ٦ ماه زمان نگهداری بر طیف بازدارندگی باکتریوسین (میلی‌متر) در رقت ۱۰^۸ CFU/mL بیماری‌زا

Table 8- The effect of 6 month of storage on bacteriocin inhibition zone (mm) in dilution 10^8 CFU/mL pathogen

باکتریوسین (Bactericin)	میکروارگانیسم شاخص (Indicator microorganisms)					
	سالمونلا تایفی-موریوم *Salmonella typhimuriyum* PTCC 1609	*اشریشیا کلی* *Escherichia coli* ATCC 25923	*استافیلوکوکوس اورئوس* *Staphylococcus aureus* ATCC 25922	*سالمونلا تایفی‌موریوم* (*Salmonella typhimuriyum*) PTCC 1609	*اشریشیا کلی* *Escherichia coli* ATCC 25923	*استافیلوکوکوس اورئوس* *Staphylococcus aureus* *ATCC* 25922
	4 °C			-20 °C		
b10A	14^{aB}	14^{aC}	18^{aA}	16^{aB}	18^{aC}	21^{aA}
bS6	15^{bB}	13^{bC}	17^{bA}	16^{bB}	16^{bC}	18^{bA}
bSa	13^{cB}	12^{cC}	15^{cA}	14^{cB}	14^{cC}	16^{cA}
bAb	11^{cdB}	12^{cdC}	14^{cdA}	15^{cdB}	14^{cdC}	17^{cdA}
نایسین (Nisin)	12^{dB}	11^{dC}	15^{dA}	14^{dB}	13^{dC}	16^{dA}

b: باکتریوسین؛ 10A: *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه ۳۳۶۰؛ V3: *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه Heal 19؛ S6: *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه ۷۲۳۲؛ Ab: *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه Lan4.

نتایج به صورت میانگین سه تکرار بیان شد. اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) نمی‌باشند. اعداد با حروف مشترک در هر ردیف دارای اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) نمی‌باشند.

b: bacteriocin; 10A: *L. plantarum* strain 3360; V3 *L. plantarum* strain Heal 19; S6: *L. plantarum* strain 7232; Sa: *L. plantarum* strain lb51; Ab: *L. plantarum* strain Lan4..

The results were expressed as the average of three repetitions. Numbers with same letters in each column do not have significant differences (p>0.05). Numbers with same letters in each row do not have a significant difference (p>0.05)

بررسی اثر pHهای مختلف بر فعالیت باکتریوسین تخلیص شده

در این بررسی باکتریوسین حاصل از جدایه‌های مختلف، در برابر pHهای ۲ تا ۱۰ تنظیم شده با HCl و NaOH قرار گرفته و پایداری اثر مهاری آن‌ها در برابر بیماری‌زاهای گرم منفی و گرم مثبت با نایسین تجاری مقایسه گردید. با توجه به نتایج (جدول ۹) در محدوده وسیع pH تمامی باکتریوسین‌های استخراج شده ویژگی ضدمیکروبی خود را در برابر سویه‌های شاخص حفظ کرده و این اثر در باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* در مقایسه با سویه‌های گرم منفی بیشتر گزارش شد، بیشترین اثر مهاری در تمامی موارد در محدوده (۸ – ۶ = pH) بود، در حالی که با افزایش و کاهش pH از محدوده خنثی به سمت اسیدی و قلیایی، روند نزولی در اثر مهاری باکتریوسین‌ها رویت گردید، که این کاهش در pHهای خیلی پایین و خیلی بالا در سطح احتمال (p<۰/۰۵) معنی‌دار بود. در pH خیلی اسیدی (pH =۲) و خیلی قلیایی (pH =۱۰) کاهش اثر بازدارندگی در مورد تمامی باکتریوسین‌ها و کاهش شدیدتر در اثر مهاری نایسین مشاهده گردید، بطوریکه در pH =۲ اثر بازدارندگی باکتریوسین‌های استخراج شده در برابر *اشریشیا کلی* صفر و برای نایسین در برابر تمامی سویه‌های شاخص اعم از گرم منفی و مثبت صفر گزارش شد. این آزمون نشان دهنده پایداری اثر مهاری باکتریوسین‌های استخراج

شده در محدوده وسیعی از pH و قوی‌تر بودن آن‌ها در مقایسه با نایسین تجاری است. نتایج این بررسی با نتایج آزمون چن و همکاران (Chen *et al.*, 2018) در مورد جداسازی و خالص‌سازی پلانتارسین ZJ 316 و نتایج علیزاده بهبهانی و همکاران (Alizadeh Behbahani *et al.*, 2021) در مورد جداسازی لاکتوباسیلوس‌های مختلف جدا شده از ماست محلی همخوانی نزدیکی داشت با این تفاوت که باکتریوسین‌های استخراج شده در پژوهش حاضر در محدوده وسیعی از pH اسیدی و قلیایی در هر دو تکرار ویژگی مهاری بیشتری از پلانتارسین ZJ 316 نشان دادند.

جدول ۹- تاثیر pHهای مختلف بر قطر هاله عدم رشد (میلی متر) باکتریوسین‌های مختلف در برابر 10^8 CFU/mL میکروارگانیسم‌های شاخص

Table 9- Effect of different pH on the diameter of inhibition zone (mm) of different bacteriocins against 10^8 CFU/mL indicator microorganisms

میکروارگانیسم شاخص Indicator microorganisms 10^8 CFU/mL	باکتریوسین Bacteriocin	pH								
		10	9	8	7	6	5	4	3	2
استافیلوکوکوس اورئوس *(Staphylococcus aureus)* ATCC25922	b10A	12.5^{dA}	15^{cA}	19^{bA}	21^{aA}	18.5^{bA}	15^{cA}	12^{dA}	10^{eA}	9^{fA}
	bS6	12^{dB}	14^{cB}	17^{bB}	19^{aB}	16.5^{bB}	15^{cB}	11^{dB}	8^{eB}	6^{fB}
	bSa	10^{dC}	12^{cC}	16^{bC}	18^{aC}	14^{bC}	13^{cC}	12^{dC}	9^{eC}	9^{fC}
	bAb	10^{dCD}	12^{cCD}	17^{bCD}	20^{aCD}	17^{bCD}	14^{cCD}	11^{dCD}	9^{eCD}	8^{fCD}
	نایسین (Nisin)	11^{dD}	14^{cD}	17^{bD}	19^{aD}	16^{bD}	13.5^{cD}	10.8^{Dd}	7^{eD}	–
اشریشیا کلی *(Escherichia coli)* ATCC25923	b10A	10^{dA}	13^{cA}	15^{bA}	17^{aA}	15^{bA}	14.2^{cA}	11^{dA}	9^{eA}	–
	bS6	10^{dB}	12^{cB}	14^{bB}	15^{aB}	14.2^{bB}	13.5^{cB}	10^{dB}	8^{eB}	–
	bSa	9.7^{dC}	11^{cC}	12^{bC}	13^{aC}	12^{bC}	11^{cC}	10^{dC}	8^{eC}	–
	bAb	9^{dCD}	10.5^{cCD}	12^{bCD}	14^{aCD}	12b^{CD}	10.5^{cCD}	9^{dCD}	7^{eCD}	–
	نایسین (Nisin)	9^{dD}	10.5^{cD}	12.5^{bD}	14.5^{aD}	12.5^{bD}	10.8^{cD}	9^{dD}	–	–
سالمونلا تایفی موریوم *(Salmonella typhimuriyum)* PTCC1609	b10A	12^{dA}	14^{cA}	17^{bA}	18^{aA}	17^{bA}	14^{cA}	11.5^{dA}	9^{eA}	6^{fA}
	bS6	11.2^{dB}	13^{cB}	16^{bB}	18^{aB}	16^{bB}	13.2^{cB}	10.5^{dB}	9^{eB}	6^{fB}
	bSa	9.5^{dC}	11.5^{cC}	15^{bC}	16^{aC}	15^{bC}	13^{cC}	11^{dC}	8^{eC}	7^{fC}
	bAb	10^{dCD}	11.5^{cCD}	15^{bCD}	17^{aCD}	15.5^{bCD}	13^{cCD}	10^{dCD}	7^{eCD}	–
	نایسین (Nisin)	10^{dD}	12^{cD}	14.2^{bD}	16^{aD}	15^{bD}	11.5^{cD}	10^{dD}	–	–
لیستریا مونوسایتوجنز *(Listeria monocytogenes)* PTCC1165	b10A	13^{dA}	15.5^{cA}	17^{bA}	19^{aA}	17.5^{bA}	14^{cA}	11.5^{dA}	9^{eA}	6^{fA}
	bS6	11^{dB}	13^{cB}	16^{bB}	18^{aB}	16^{bB}	14^{cB}	11^{dB}	9^{eB}	6^{fB}
	bSa	10^{dC}	11^{cC}	16.3^{bC}	19^{aC}	15^{bC}	12^{cC}	11^{dC}	8^{eC}	6^{fC}
	bAb	12^{dCD}	15^{cCD}	15^{bCD}	17^{aCD}	15^{bCD}	12^{cCD}	10^{dCD}	7^{eCD}	–
	نایسین (Nisin)	12^{dD}	16^{cD}	17.5^{bD}	19^{aD}	17^{bD}	14^{cD}	10^{dD}	7^{eD}	–

b: باکتریوسین؛ 10A:*لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه ۳۳۶۰؛ V3: *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه Heal 19؛ *S6:: لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه ۷۲۳۲؛ Ab: *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه Lan4.

نتایج به صورت میانگین سه تکرار بیان شد. اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) نمی‌باشند. اعداد با حروف مشترک در هر ردیف دارای اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) نمی‌باشند.

b: bacteriocin; 10A: *L. plantarum* strain 3360; V_3 *L. plantarum* strain Heal 19; S_6: *L. plantarum* strain 7232; Sa: *L. plantarum* strain lb51*;* Ab: *L. plantarum* strain Lan4.

The results were expressed as the average of three repetitions. Numbers with same letters in each column do not have significant differences (p>0.05). Numbers with same letters in each row do not have a significant difference (p>0.05).

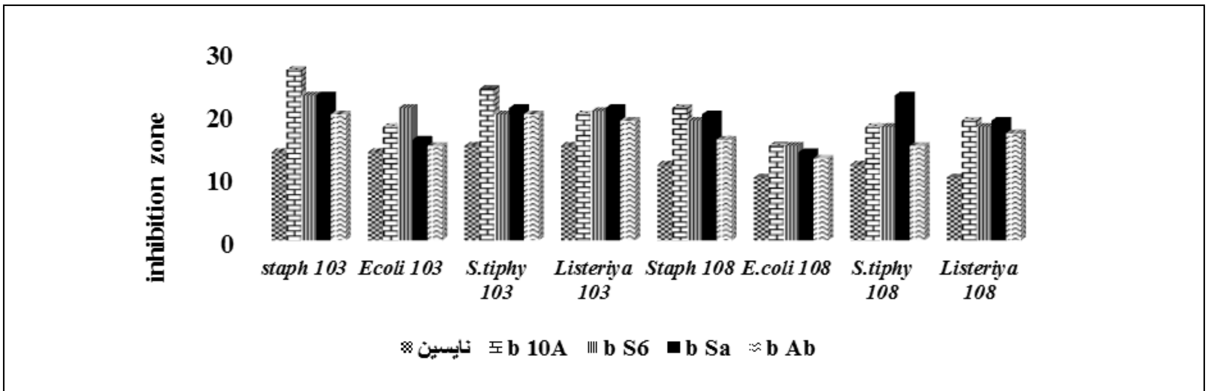
جدول ۱۰- MIC و MBC باکتریوسین‌های خالص شده و نایسین علیه شاخص‌های گرم مثبت و منفی

Table 10- MIC and MBC of purified bacteriocins and Nisin against Gram positive and Gram negative indicators

میکروارگانیسم شاخص (Indicator microorganisms) ۱۰۶ CFU/mL	باکتریوسین (Bacteriocin)	غلظت (Concentration- ppm) 650	480	240
	b10A	–	MIC	MBC
استافیلوکوکوس اورئوس	bS6	MIC	MBC	–
(*Staphylococcus aureus*)	bSa	MIC	MBC	–
ATCC25922	bAb	–	MIC	MBC
	نایسین (Nisin)	MIC	MBC	–
	b10A	–	MIC	MBC
اشریشیا کلی	bS6	MIC	MBC	–
(Escherichia coli)	bSa	MIC	MBC	–
ATCC25923	bAb	–	MIC	MBC
	نایسین (Nisin)	MIC	MBC	–

b: باکتریوسین؛ 10A: *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه ۳۳۶۰؛ V3: *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه Heal 19؛ *S6*: *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه ۷۲۳۲؛ Ab: *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* گونه Lan4.

b: bacteriocin; 10A: *L. plantarum* strain 3360; V_3 *L. plantarum* strain Heal 19; S_6: *L. plantarum* strain 7232; Sa: *L. plantarum* strain lb51*;* Ab: *L. plantarum* strain Lan4.



شکل ۵- مقایسه اثر باکتریوسین‌های استخراج شده با نایسین تجاری در مهار سویه‌های شاخص در رقت ۱۰^۳ و ۱۰^۸

Fig. 6- Comparison of the effect of bacteriocins with commercial nisin in inhibiting the indicator strains in dilution 10^3 and 10^8

مقایسه فعالیت باکتریوسین‌های استخراج شده با نایسین تجاری

با توجه به نتایج MIC (جدول ۱۰) و برگه راهنمای نایسین، محلول ۶۵۰ میلی‌گرم در اسیدکلریدریک ۰/۰۲ نرمال معادل AU/ml ۶۵۰ باعث توقف رشد بیماری‌زاها در هر دو رقت ۱۰^۸ و ۱۰^۳ گردید، رقت‌های مساوی از باکتریوسین‌های استخراج شده و نایسین تهیه و بعد از انجام آزمون چاهک‌گذاری در محیط مولرهینتون آگار بذردهی شده با رقت‌های ۱۰^۳ و ۱۰^۸ از باکتری‌های شاخص از نظر ویژگی بازدارندگی مورد ارزیابی قرار گرفتند. با توجه به شکل ۵ در رقت پایین سویه‌های بیماری‌زا فعالیت باکتریوسین جدا شده از سویه ۳۳۶۰ (b۱۰A)[1] در مقایسه با سه باکتریوسین دیگر و حتی نایسین بیشتر گزارش شد. ویژگی بازدارندگی تمامی باکتریوسین‌های استحصال شده در رقت ۱۰^۸ CFU/mL بیماری‌زا نیز حفظ گردید. با توجه به منابع، بیشترین اندازه هاله بازدارنده از رشد برای نایسین، در برابر *لیستریا مونوسایتوژنز* هست که در مقایسه با نتایج این آزمایش ویژگی ضدلیستریایی نایسین را ثابت می‌کند. نتایج این آزمایش با مطالعات

1- Bacteriocin 10A

بنچ و همکاران (Benech *et al*., 2002) استفاده از نایسین Z برای متوقف کردن رشد *لیستریا اینوکوآ* و نتایج پژوهش انجام شده توسط شکری و همکاران (Shokri *et al*., 2013) در مورد ویژگی آنتی *لیستریایی* پلانتارسین DSH2O و مطالعات آشاری و همکاران (Ashari *et al*., 2019) بررسی حداقل مقدار کشندگی نایسین و همخوانی نزدیکی دارد. بالا بودن ویژگی ضدمیکروبی باکتریوسین-های استخراج شده در این آزمون در مقایسه با مقدار یکسان نایسین تجاری با باکتریوسین‌های استخراج شده از سویه‌های مختلف، نشان دهنده قدرت و فعالیت بالای آن‌ها در مقایسه با نایسین در مهار بیماری‌زا است (شکل ۵).

نتیجه‌گیری

امروزه بحث‌هایی در مورد کاربرد مواد ضدمیکروبی بیولوژیک در سیستم‌های غذایی به‌عنوان محافظ، در مقابل بیماری‌زاهای بیماری‌زا و عامل فساد وجود دارد که طی آن بر جست و جوی مواد و تکنولوژی‌های نوین برای نگهداری غذا و افزایش زمان ماندگاری آن ها بدون کاربرد مواد شیمیایی سنتزی در صنعت غذا تاکید شده است. در این میان باکتریوسین‌ها به دلیل ویژگی‌های مطلوب، ماهیت پروتئینی، عدم سمیت، قابلیت هضم بالا در برابر آنزیم‌های گوارشی و داشتن خصوصیت ضدمیکروبی مهم تلقی شده‌اند. یافته‌های این پژوهش نشان داد باکتریوسین تمامی سویه‌های *لاکتی پلانتی باسیلوس پلانتاروم* علاوه بر باکتری‌های گرم مثبت بر باکتری‌های گرم منفی مانند *لیستریا مونو سایتوژنز*، *سالمونلا تایفی‌موریوم* و *اشریشیا کلی* در رقت ۱۰^۸ دارای ویژگی بازدارندگی بودند و تحت تاثیر آنزیم‌های پپسین و پروتئیناز K این ویژگی با کاهش فعالیت باکتریوسین از بین می‌رود. با توجه به اینکه تمامی باکتریوسین‌های تولید شده در این پژوهش به درجه حرارت‌های بالا تا دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد (دمای اتوکلاو) مقاوم بودند، پایداری اثر مهاری در pHهای اسیدی و قلیایی و همچنین پایداری حرارتی، ویژگی‌های مهمی برای باکتریوسین‌های خالص شده محسوب می‌شود چرا که استفاده از آن‌ها را به عنوان محافظ میکروبی فراورده‌های غذایی و دارویی که در طی فرایند، نگهداری و بسته بندی آن‌ها از حرارت‌های بالا استفاده می‌شود، میسر می‌سازد. هر چهار باکتریوسین حاصل در مقایسه با نایسین تجاری شده (Niseen – S) که در صنعت غذا به عنوان نگهدارنده بیولوژیک کاربرد زیادی داشته است، در رقت ۱۰^۸ بیماری‌زاهای شاخص دارای فعالیت بازدارندگی و هاله عدم رشد بزرگتری بودند. بدنبال خالص‌سازی و جداسازی این پپتیدها، پژوهش در خصوص ریزپوشانی و استفاده از این عوامل در فراورده‌های غذایی با محدوده pH اسیدی و قلیایی از جمله انواع آبمیوه‌ها، فراورده‌های گوشتی و انواع سس‌ها، بصورت ریزپوشانی شده و آزاد ادامه دارد.

سپاسگزاری

از مرکز مطالعات و همکاری‌های بین‌المللی به دلیل حمایت مالی در انجام این پروژه قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Abdollahzadeh, A., Rezaei, M., Hosseini, H., & Safari, R., (2012). The effect of nisin and thyme essential oil of Shirazi thyme alone and in combination on the population of *Listeria monocytogenes* inoculated in the minced meat of phytophagous fish. *Iranian Journal of Food Science*, *4*, 13-20.
2. Ahn, H., Kim, J., & Kim, W.J. (2017). Isolation and characterization of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* HW01 from malt and its potential to control beer spoilage lactic acid bacteria. *Food Control*, *80*, 59-66. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.04.022.
3. Alirezalu, K., Hesari, J., Besharti, M., Yaghoubi, M., Nemati, Z., & Malayeri., H. (2020). Investigation the effects of nisin and nisin nanoparticles on physicochemical, microbial, sensory and shelf life of Frankfurter sausages. *Research and Innovation in Food Science and Technology*, *9*, 221-236. https://doi.org/10.22101/JRIFST.2020.195438.1108.
4. Alizadeh Behbahani, B., Noshad, M., & Joyandeh, H. (2021). Evaluation of activity and characterization of bacteriocin produced by lactobacilli bacteria isolated from local yogurt in Behbahan city. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Industry*, *16*(2), 111-120. https://doi.org/10.52547/nsft.16.2.111
5. Alizadeh, P., Jamalifar, H., Samadi, N., Eidi, A., & Fazeli, M. (2010). The effect of NaCl on the growth and antimicrobial properties of Lactobacillus isolated from sourdough of traditional breads in Markazi province. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Industry*, *5*(3), 47-56.
6. Ashari, D., Nissa, A., Nursiwi, A., Sari, A., & Utami, R. (2019). Antimicrobial effect of *Zingiber officinale* var. officinale essential oil and nisin against pathogenic and spoilage microorganisms. Paper presented at the IOP Conference Series: *Materials Science and Engineering*. https://doi.org/10.1088/1757-899X/633/1/012005.
7. Ashtiani, S.H.M., Rafiee, M., Morad, M.M., Khojastehpour, M., Khani, M.R., Rohani, A., Shokri, B., & Martynenko, A. (2020). Impact of gliding arc plasma pretreatment on drying efficiency and physicochemical

properties of grape. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *63*, 102381. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102381.

8. Attar, M.A., Yavarmanesh, M., Mortazavi, A., Dovom, M.R.E., & Najafi, M.B.H. (2018). Antibacterial effects of *Lactococcus lactis* isolated from Lighvan cheese regarding the recognition of Nisin, Lacticin and Lactococcin structural genes. *LWT-Journal of Food Science and Technology*, *89*, 186-191. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.044.
9. Benech, R.O., Kheadr E.E., Laridi R., Lacroix C., & Fliss I. (2002). Inhibition of listeria innocua in Cheddar cheese by addition of Nisin Z in Liposomes or by in situ production in mixed culture. *Applied and Environmental Microbiolgy*, *68*(8), 3683-3690. https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3683-3690.2002.
10. Blana, V.A., Grounta, A., Tassou, C.C., Nychas, G.J.E., & Panagou, E.Z. (2014). Inoculated fermentation of green olives with potential probiotic *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures isolated from industrially fermented olives. *Food Microbiology*, *38*, 208-218. https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.007.
11. Calo-Mata, P., Arlindo, S., Boehme, K., de Miguel, T., Pascoal, A., & Barros-Velazquez, J. (2008). Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. *Food and Bioprocess Technology*, *1*, 43-63. https://doi.org/10.1007/s11947-007-0021-2.
12. Chen, L., Gu, Q., Li, P., Li, Y., Song, D., & Yang, J. (2018). Purification and characterization of plantaricin ZJ316, a novel bacteriocin against *listeria monocytogenes* from *lactobacillus plantarum* ZJ316. *Journal of Food Protection*, *81*, 1929-1935. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-306.
13. Cotter, P.D., Stanton, C., Ross, R.P., & Hill ,C. (2012). The impact of antibiotics on the gut microbiota as revealed by high throughput DNA sequencing. *Discovery Medicine*, *13*, 193-199.
14. Ebrahimi, Z., Ismaili, A., Ahmadi, T.A., Emami, H., & Rabbani, M. (*2016*). Isolation and molecular identification of *Lactobacillus brevis* from native vinegar. *Biology of Microorganisms*, *5*, 95-106. https://doi.org/10.22108/bjm.2016.20386.
15. El-Shouny, W., Abo-Kamar, A., El-Shanshoury, A.E.R., & Ragy, S. (2020). Production of plantarcin by *Lactobacillus plantarum* SR18. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, *9*, 1488-1504.
16. Fagundes, C., Sousa Santos, N., Albano, M., & Bastos, F. (2017). Genetic and biochemical characterization of hyicin 3682, the first bacteriocin reported for *Staphylococcus hyicus*. *Microbiological Research*, *198*, 36-46. https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.02.003.
17. Ferchichi, M., Valcheva, R., Prévost, H., Onno, B., & Dousset, X. (2007). Molecular identification of the microbiota of French sourdough using temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Food Microbiology*, *24*, 678-686. https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.04.001
18. Garriga, M., Hugas, M., Aymerich, T., & Monfort, J. (1993). Bacteriocinogenic activity of lactobacilli from fermented sausages. *Journal of Applied Bacteriology*, *75*, 142-148. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb02759.x.
19. Gonzalez, B., Arca, P., Mayo, B., & Suárez, J.E. (1994). Detection, purification, and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a Lactobacillus plantarum strain of dairy origin. *Applied and Environmental Microbiology*, *60*, 2158-2163. https://doi.org/10.1128/aem.60.6.2158-2163.1994
20. Grosu-Tudor, S.S., & Zamfir, M. (2011). Isolation and characterization of lactic acid bacteria from Romanian fermented vegetables. *Romanian Biotechnological Letters*, *16*, 148-154.
21. Hosseininezhad, M., & Yazdi, M. (2016). Bacteriocins: Natural, safe, bio-preservatives and viable alternatives to chemical additives. *Journal of Biosafety*, *9*, 49-59. https://doi.org/20.1001.1.27170632.1395.9.2.8.2
22. Hu, M., Zha, H., Chong Zhang, C., Jiansheng, Yu, J., & Lu, Z. (2013). Purification and characterization of plantaricin 163, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 163 isolated from traditional Chinese fermented vegetables. *Journal of Agricaltural and Food Chemistry*, *61*, 11676−11682. https://doi.org/10.1021/jf403370y.
23. Hwanhlem, N., Ivanova, T., Biscola, V., Choiset, Y., & Haertle, T. (2017). Bacteriocin producing *Enterococcus faecalis* isolated from chicken gastrointestinal tract originating from Phitsanulok, Thailand: Isolation, screening, safety evaluation and probiotic properties. *Food Control*, *78*, 187-195. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.060.
24. Jiménez-Díaz, R., Rios-Sanchez, R., Desmazeaud, M., Ruiz-Barba, J.L., & Piard, J.C. (1993). Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, *59*, 1416-1424. https://doi.org/10.1128/aem.59.5.1416-1424.1993.
25. Kazemipoor, M., Radzi, C.W.J.W.M., Begum, K., & Yaze, I. (2012). Screening of antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from fermented vegetables against food borne pathogens. *ArXiv Preprint ArXiv*, 1206-6366. https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0272.

26. Kelly, W., Asmundson, R., & Huang, C. (1996). Characterization of plantaricin KW30, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Bacteriology*, *81*, 657-662. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1996.tb03561.x.
27. Kumari, K., Sharma, S., & Kaundal, K. (2018). Production, purification and efficacy of bacteriocin isolated from natural lactic acid fermentation of wild Himalayan fig fruit. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, *12*, 879-885. https://dx.doi.org/10.22207/JPAM.12.2.50
28. Miraei Ashtiani, S.H., Aghkhani, M.H., Feizy, J., & Martynenko, A. (2023). Effect of cold plasma pretreatment coupled with osmotic dehydration on drying kinetics and quality of mushroom (A*garicus bisporus*). *Food and Bioprocess Technology*, 1-23. https://doi.org/10.1007/s11947-023-03096-z.
29. Miraei Ashtiani, S.H., Rafiee, M., Mohebi Morad, M., & Martynenko, A. (2022). Cold plasma pretreatment improves the quality and nutritional value of ultrasound-assisted convective drying: The case of goldenberry. *Drying Technology*, *40*(8), 1639-1657. https://doi.org/10.1080/07373937.2022.2050255.
30. Navarro, L., Zarazaga, M., Aenz, J., Ruiz- Larrea, F., & Torres, C. (2000). Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines. *Journal of Applied Microbiology*, *88*, 44-51. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00865.x.
31. Noktehsanj Avval, M., Hosseininezhad, M., Pahlavanlo, A., & Ghoddusi, H.B. (2023). Creating optimal conditions for bacteriocin production from *Lactiplantibacillus plantarum* isolated from traditionally fermented fruits and vegetables. *Research and Innovation in Food Science and Technology*, *11*(4), 351-366. https://doi.org/10.22101/JRIFST.2022.331749.1332.
32. Persulessy, C.B., Kusdiyantini, E., Ferniah, R.S., Agustini, T.W., & Budiharjo, A. (2020). Ina sua: The traditional Food Fermentation from Teon Nila Serua, Central of Maluku, Indonesia. *Journal of Ethnic Foods*, *7*(1), 1-7. https://doi.org/10.1186/s42779-020-00055-3.
33. Rodríguez, E., Arqués, J.L., Rodríguez, R., Peirotén, Á., Landete, J.M., & Medina, M. (2012). Antimicrobial properties of probiotic strains isolated from breast-fed infants. *Journal of Functional Foods*, *4*, 542-551. https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.02.015.
34. Schliep, K.P. (2011). phangorn: phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics*, *27*, 592-593. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq706
35. Shahidi, F., Heydari, Sh., & Shahidi, M. (2014). *Production of oral antimicrobial film to inhibit Listeria monocytogenes in meat*. Paper presented at the 3rd National Conference on Food Science and Technology Quchan.
36. Shokri, D., Zaghian, S., Fazeli, H., Mobasherizadeh, S., & Ataei, B. (2013). Isolation and Purification of an Ultraviolet-Stable Bacteriocin Produced by Enterococcus Faecium Strain DSH20 against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Isfahan Medical School*, *31*, 236-242. http://jims.mui.ac.ir/article_14071_20f000224d7a9652dfd89c1d4f6fb8df.pdf
37. Singh, S., & Sethi, S. (2018). *Fermentation Technology in Vegetables Advances in Postharvest Technologies of Vegetable*, Apple Academic Press, 355-379. https://doi.org/10.1201/9781315161020
38. Szutowska, J., & Gwiazdowska, D. (2021). Probiotic potential of lactic acid bacteria obtained from fermented curly kale juice. *Archives of Microbiology*, *203*, 975-988. https://doi.org/10.1007/s00203-020-02095-4.
39. Tafvizi, F., & Tajabadi Ebrahimi, M. (2012). DNA Fingerprinting Based on Repetitive Sequences of Iranian Indigenous Lactobacilli Species by (GTG)5- REP-PCR. *Journal of Fasa University of Medical Sciences*, *2*, 218-226. http://dorl.net/dor/20.1001.1.22285105.2012.2.3.14.2
40. Thomas, L., & Delves-Broughton, J. (2005). *Nisin. Antimicrobials in Food.* Davidson PM, Sofos JN and Branen AL New York , NY: CRC Press. https://doi.org/10.1201/9781420028737
41. Tiwari, S. K., & Srivastava, S. (2008). Purification and characterization of plantaricin LR14: a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LR/14. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *79*, 759-767. https://doi.org/10.1007/s00253-008-1482-6
42. Todorov, S., Onno, B., Sorokine, O., Chobert, J., Ivanova, I., & Dousset, X. (1999). Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST 31 isolated from sourdough. *International Journal of Food Microbiology*, *48*, 167-177. https://doi.org/10.1016/s0168-1605(99)00048-3.
43. Udhayashree, N., Senbagam, D., Senthilkumar, B., Nithya, K., & Gurusamy, R. (2012). Production of bacteriocin and their application in food products. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *2*, S406-S410. https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60197-X.
44. Xiang, Y.Z., Li, X.Y., Zheng, H.L., Chen, J.Y., Lin, L.B., & Zhang, Q.L. (2021). Purification and antibacterial properties of a novel bacteriocin against Escherichia coli from *Bacillus subtilis* isolated from blueberry ferments. *LWT-Journal of Food Science and Technology*, *146*, 111456. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111456.

45. Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H., Mattarelli, P., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus Lactobacillus: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus Beijerinck* 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *70*(4), 2782-2858. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107.